

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANDRESSA BARBOZA DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL
COM OS POLIMORFISMOS MTHFR C677T, MTHFR A1298C
E CBS 844ins68 NA POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA

2013

ANDRESSA BARBOZA DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL
COM OS POLIMORFISMOS MTHFR C677T, MTHFR A1298C
E CBS 844ins68 NA POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro.

VITÓRIA

2013

ANDRESSA BARBOZA DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL
COM OS POLIMORFISMOS MTHFR C677T, MTHFR A1298C
E CBS 844ins68 NA POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 18 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profª. Drª. Sandra Lucia Ventorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
Universidade Vila Velha

Profª. Drª. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva
Faculdade Católica Salesiana

VITÓRIA

2013

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos;

À FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo) pelo financiamento concedido;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, pela oportunidade e por todo apoio para realização do mestrado;

À Prof^a Dr^a. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, pelas valiosas dicas e ajuda indispensáveis para realização deste trabalho;

À Prof^a Dr^a. Sandra Lucia Ventorin von Zeidler, pela captação e fornecimento das amostras;

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, pela colaboração essencial;

Ao colega Marcelo Santos pela ajuda crucial com os testes estatísticos, e aos demais colegas pela troca de experiências;

A todos os meus amigos e familiares que sempre torceram por mim;

À minha família, que é meu alicerce, agradeço pelo exemplo e educação que recebi dos meus pais e ao carinho do meu irmão.

Ao Felipe, meu marido, pelo apoio e compreensão, pela torcida, e por tornar meus dias mais felizes nos momentos de preocupação e estresse.

RESUMO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é um sério problema de saúde pública, pois apresenta altas taxas de mortalidade e aumento crescente nas incidências em todo mundo. Estudos epidemiológicos indicam que a suscetibilidade ao CEO é mediada por fatores ambientais e genéticos. Os fatores ambientais incluem o tabagismo, etilismo e infecções por HPV. Dentre os fatores genéticos, observa-se que certas variantes gênicas podem conferir suscetibilidade à doença. Pesquisas sugerem que polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem modular o risco de CEO por alterar a metilação, síntese de DNA e estabilidade genômica. Dentre as variantes gênicas estão os polimorfismos C677T e A1298C no gene MTHFR que codifica a enzima Metilenotetrahidrofolato redutase e o polimorfismo CBS 844ins68 no gene CBS que codifica a enzima Cistationina beta-sintetase. A atividade catalítica das enzimas codificadas por estas variantes encontra-se alterada, podendo influenciar na suscetibilidade ao câncer. Foram incluídos na pesquisa 101 casos e 102 controles para investigação da associação destes polimorfismos com o câncer oral. Para detecção dos polimorfismos foram utilizadas as técnicas de PCR e PCR-RFLP. Os cálculos estatísticos foram realizados através do software Epi Info[®] v3.4.3 (IC 95%). A análise de risco nos grupos caso/controle não demonstrou correlação entre os genótipos estudados e o câncer oral. O MTHFR C677T está relacionado com linfonodos negativos. A combinação dos genótipos CT+TT atua como fator protetor, revelando um risco de comprometimento de linfonodos três vezes menor comparado ao genótipo CC ($p = 0,012$). O polimorfismo A1298C está relacionado com o grau de diferenciação tumoral. Combinados, os genótipos AC+CC foram mais frequentes nos tumores bem diferenciados ($p = 0,007$). Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo 844ins68 e as variáveis avaliadas. Concluímos que os polimorfismos analisados não influenciam na suscetibilidade ao câncer oral na população do ES, entretanto os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C estão associados ao prognóstico, sugerindo que sejam úteis como marcadores de prognóstico para pacientes com CEO.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide oral. MTHFR C677T. MTHFR A1298C. CBS 844ins68.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a serious public health problem due to high mortality and rising incidence worldwide. Epidemiological studies suggest that OSCC susceptibility is mediated by interactions between genetic and environmental factors. Environmental factors include smoking, alcohol use and HPV infections. Among genetic factors, it has been observed that certain genetic variants may confer susceptibility to this disease. Studies suggest that genetic variants encoding enzymes involved in folate metabolism may modulate OSCC risk by altering DNA methylation patterns and genomic stability. Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene that encodes the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme and the CBS 844ins68 polymorphism in the CBS gene that encodes the Cystathionine beta-synthase enzyme may be associated with oral cancer susceptibility due to changes in catalytic activity.

This study included 101 cases and 102 controls to investigate the association of these polymorphisms with OSCC. The genotypes were identified by PCR and PCR-RFLP analysis in blood samples collected from all participants. Statistical calculations were performed using Epi Info[®] v3.4.3 (95% CI). According to risk analysis, no correlation was observed between the genotypes and OSCC. MTHFR C677T polymorphism was associated with negative lymph nodes. CT + TT genotypes worked as protective factors, revealing a risk of lymph node positivity three times lower than the CC genotype ($p = 0.012$). A1298C polymorphism was related to tumor differentiation. AC + CC genotypes were more frequently present in well-differentiated tumors ($p = 0.007$). There was no statistically significant association between CBS844ins68 polymorphism and variables evaluated in our study. We concluded that the MTHFR C677T, MTHFR A1298C and CBS 844ins68 polymorphisms is not associated with OSCC risk in the Espirito Santo State, Brazil, however MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are associated with prognosis, suggesting that they may be useful prognostic markers for OSCC patients.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. MTHFR C677T. MTHFR A1298C. CBS 844ins68.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo do ácido fólico	18
Figura 2 – Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo MTHFR C677T	27
Figura 3 – Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo MTHFR A1298C	28
Figura 4 – Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo CBS 844ins68	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de risco para sexo e idade nos grupos caso/controle.....	31
Tabela 2 – Frequência genotípica dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68	32
Tabela 3 – Frequência alélica dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68	33
Tabela 4 – Análise de risco dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68 nos grupos caso/controle	34
Tabela 5 – Análise do polimorfismo C677T x características clinicopatológicas....	35
Tabela 6 – Análise multivariada do polimorfismo MTHFR C677T	36
Tabela 7 – Análise do polimorfismo A1298C x características clinicopatológicas .	37
Tabela 8 – Análise do polimorfismo 844ins68 x características clinicopatológicas.	38

LISTA DE SIGLAS

CBS	Cistationina β -sintetase
CCS	Centre de Ciências da Saúde
CEO	Carcinoma Epidermóide Oral
CIAS	Centro Integrado de Atenção à Saúde
HPV	Papilomavírus humano (do inglês <i>Human Papiloma Vírus</i>)
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MS	Ministério da Saúde
MS	Metionina sintetase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Chance de possibilidades (do inglês <i>Odds Ratio</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SAM	S-adenosilmetionina
TA	Temperatura de Anelamento
TNM	Tamanho do tumor (T); acometimento dos linfonodos e sua extensão (N); e presença ou não de metástases distantes (M).
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UICC	União Internacional Contra o Câncer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Carcinoma Epidermóide Oral (CEO).....	10
1.2 Epidemiologia.....	10
1.3 Diagnóstico.....	11
1.4 Fatores de risco e suscetibilidade genética	14
1.5 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)	17
1.6 Cistationina β -sintetase (CBS).....	19
1.7 Polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C e CBS 844ins68.....	20
1.8 Frequências dos genótipos nas populações.....	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Gerais.....	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1 Casuística	25
3.2 Análise molecular	25
3.2.1 Amostras	25
3.2.2 Extração do DNA.....	26
3.2.3 Genotipagem.....	26
3.3 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma Epidermóide Oral (CEO)

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, também conhecido por carcinoma espinocelular, ou carcinoma de células escamosas, está entre os cinco tipos de cânceres mais comuns no mundo e ocupa a sexta posição em mortalidade por câncer (DANIEL et al., 2006). Geralmente os pacientes são diagnosticados num estágio tardio, especialmente em países em desenvolvimento onde esse tipo de câncer é mais comum (RODRIGUES et al., 2010). Incluídos nesse grupo de neoplasias estão boca, faringe, cavidade nasal, laringe, e glândulas (COLOMBO e RAHAL, 2009). Excluindo-se o câncer de pele, o câncer na cavidade bucal pode ser considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço (38%) (STEWART & KLEIHUES, 2003). A cavidade bucal está dividida em lábio e região intraoral (língua, mucosa jugal, assoalho, gengiva, área retromolar e palato duro) (INCA, 2001).

Segundo Galbiatti et al. (2012), cerca de dois terços dos pacientes com câncer oral apresentam a doença em estágio avançado, geralmente envolvendo linfonodos regionais. Devido ao diagnóstico tardio, o carcinoma oral geralmente tem um mau prognóstico. O tipo mais comum é o carcinoma epidermóide, e pode acometer qualquer parte da cavidade oral (LOURENÇO et al., 2006; PADILLA & RITTER, 2008; SAILASREE et al., 2011; CHIU et al., 2013). Segundo Neville et al. (2002), o local mais comum de carcinoma intraoral é a língua, que representa cerca de 40% dos casos de câncer oral.

Vários fatores são citados como preditores de um mau prognóstico, como a fase do tumor, o estado da margem cirúrgica, a extensão da metástase nodal, invasão perineural e infiltração linfática (FAN et al., 2007).

1.2 Epidemiologia

As taxas de incidência e mortalidade para carcinoma epidermóide oral variam entre países, e até mesmo entre estados. Tais diferenças se devem, principalmente, aos

hábitos, características socioeconômicas, expectativa de vida, fatores ambientais, raça, educação preventiva e qualidade de assistência médica (OLIVEIRA et al., 2006; BRENER et al., 2007).

Segundo a Sociedade Americana, mais de 34 mil americanos são diagnosticados com câncer oral a cada ano (PADILLA & RITTER et al., 2008). Na Índia, a alta incidência de câncer oral, segundo estudos realizados, está associada aos aspectos culturais, étnicos e a popularidade de hábitos viciantes, como o tabagismo (BYAKODI et al., 2012)

No Brasil a estimativa de novos casos de câncer de boca para o ano de 2012 foi de 14.170, sendo 9.990 para o sexo masculino e 4.180 para o sexo feminino. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil homens e quatro a cada 100 mil mulheres. Para o Espírito Santo, a estimativa foi de 380 novos casos, sendo 50 para a capital. O número de mortes no país chegou a 4.891 no ano de 2010, destes, 3.882 eram homens e 1.009 mulheres (INCA, 2012).

O câncer oral é um problema de saúde pública devido às altas taxas de letalidade, e deve ser encarado como um problema prioritário devido às possibilidades de diagnóstico precoce (TEIXEIRA et al., 2009).

1.3 Diagnóstico

Clinicamente a lesão inicial pode se apresentar como uma alteração leucoplásica ou eritroleucoplásica (PEREZ-ORDEÑEZ et al., 2006). Conforme sua evolução ocorre crescimento exofítico ou endofítico de base endurecida e áreas de necrose. O diagnóstico definitivo do câncer oral deve ser realizado através de exame anatomopatológico, pois pode ser confundido com outras doenças com manifestações bucais, como sífilis e tuberculose. Em casos avançados, em que haja suspeita de comprometimento ósseo subjacente, o exame radiográfico é esclarecedor (DANIEL et al., 2006).

O diagnóstico por imagem é uma importante ferramenta no diagnóstico. A Tomografia computadorizada e a ressonância magnética são realizadas com

contraste para determinação da extensão do tumor primário, invasão, linfonodos regionais e metástase à distância (NEVILLE et al., 2002).

O sistema de estadiamento clínico TNM permite avaliar as características fundamentais do carcinoma oral: extensão local, disseminação regional e metástase à distância (BRENER et al., 2007). Esse sistema foi desenvolvido pelo francês Pierre Denoix para classificação de tumores malignos, anos depois foi adotado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) com a finalidade de unificar a linguagem dos oncologistas. A classificação por esse sistema depende de três características: tamanho do tumor (T); acometimento dos linfonodos e sua extensão (N); e presença ou não de metástases distantes (M). Quanto maior a classificação do estadiamento, pior o prognóstico (MS, 2004). Nos **Quadros 1 e 2** estão representados o sistema de estadiamento e as categorias de estadiamento clínico TNM para CEO.

Quadro 1: Sistema de estadiamento TNM para CEO.

TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO - T	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm
T3	Tumor com mais de 4 cm
T4	T4a (lábio) – Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca ou pele da face (queixo ou nariz); T4a (cavidade oral) – Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua, seios maxilares ou pele da face; T4b (lábio e cavidade oral) – Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.
ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL - N	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm. N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm; N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm; N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm.
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm
ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES - M	
MX	A presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: MS, 2004.

Quadro 2: Categorias de estadiamento clínico TNM para CEO.

ESTÁDIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1 ou T2 N1 M0 T3 N0 ou N1 M0
IV	IVA– T1, T2, T3 N2 M0 ou T4a N0, N1, N2M0 IVB– Qualquer T N3 M0 ou T4b com qualquer N M0 IVC– Qualquer T com qualquer N M1

Fonte: MS, 2004.

Quanto à classificação de gradação histopatológica a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece: i) Pouco diferenciados – predomínio de células imaturas; numerosas mitoses típicas e atípicas; mínima ceratinização. ii) Moderadamente diferenciados – certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica; pouca ceratinização. iii) Bem diferenciados – aspecto tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso (LOURENÇO et al., 2007).

1.4 Fatores de risco e suscetibilidade genética

A maior incidência de câncer oral é observada em indivíduos acima dos 40 anos de idade, e os fatores de risco mais conhecidos são o uso de tabaco e álcool. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 90% dos pacientes diagnosticados são fumantes. O cigarro representa o maior risco para o desenvolvimento dessa doença, e o risco varia de acordo com o consumo. Quando associado ao consumo regular de bebidas alcoólicas esse risco aumenta (INCA, 2012). Os resultados do estudo realizado por Zhang et al. (2000), sugerem que mesmo fumantes passivos tem um risco aumentado para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Conforme descrito por Pai & Westra (2008), exposição à carcinógenos, dieta com baixos padrões nutricionais, má higiene oral, agentes infecciosos, história familiar e serviço médico deficiente, individualmente ou em conjunto, tem relação com o desenvolvimento do câncer epidermóide de cabeça e pescoço.

A maior parte dos casos de câncer oral está associada ao consumo de tabaco (fumo, mastigação ou rapé), consumo de álcool em excesso, ou infectados com determinados tipos de papilomavírus humano (HPV). Mas também se desenvolve em indivíduos sem nenhum fator de risco conhecido (PADILLA & RITTER, 2008; BHATNAGAR et al., 2012).

No cigarro são encontradas cerca de 50 substâncias carcinogênicas. Já o consumo frequente de bebida alcoólica impede que as células epiteliais formem a barreira de proteção contra agentes externos, permitindo assim a entrada facilitada dos agentes

carcinógenos presentes no cigarro, que irão formar adutos de DNA que não são reconhecidos durante o processo de replicação podendo causar mutações e câncer (GALBIATTI et al., 2012). O álcool potencializa os efeitos do tabagismo devido a sua propriedade química solvente, aumentando e prolongando a exposição da mucosa oral aos agentes cancerígenos presentes no tabaco (PAI & WESTRA, 2008; HASHIBE et al., 2007).

Um mecanismo possível pelo qual o consumo de álcool pode influenciar o risco de câncer oral é o acúmulo de acetaldeído – metabólito intermediário e potencial carcinógeno humano – durante a metabolização do etanol em alguns indivíduos. O acetaldeído se acumula intracelularmente, exercendo seus efeitos sobre o DNA epitelial (OGDEN & WIGHT, 1998).

O consumo de bebidas alcoólicas, tanto diretamente quanto associado à deficiência de folato, pode interferir na metilação do DNA reduzindo a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), reduzindo a atividade da metionina sintetase (MS), diminuindo os níveis de glutatona e inibindo a atividade da DNA metilase. Tais reações são importantes para a regulação epigenética da expressão do gene, manutenção da integridade do DNA e estabilidade cromossômica, que estão implicados no desenvolvimento de câncer (HAMID, WANI e KAUR, 2009).

Há também evidências de que hábitos alimentares com baixos padrões nutricionais podem ser fatores coadjuvantes na etiologia do câncer oral. Uma dieta saudável, rica em cereais integrais, frutas e vegetais pode estar associada à redução do risco (NEVILLE et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2009). A deficiência de folato, nutriente presente em frutas e vegetais, está associada ao aumento do risco de vários tipos de câncer, entre eles, o câncer de cabeça e pescoço (GALBIATTI et al., 2012).

Os folatos são membros das vitaminas do complexo B, necessárias para a síntese de nucleotídeos e metilação (BALAMURUGAN e SAID, 2006). As reações de transferência de carbono necessárias para esses processos dependem da manutenção da homeostase intracelular de folato (BALAMURUGAN e SAID, 2003). Como os mamíferos são incapazes de sintetizar o folato, os requisitos devem ser supridos através de fontes nutricionais (HAMID, WANI e KAUR, 2009). O ácido fólico é a forma mais estável de folato, e necessita ser reduzido *in vivo* em dihidrofolato e tetrahidrofolato (BALUZ et al., 2002). As diferentes formas de folato são essenciais

para a síntese de purinas, remetilação da metionina (para o metabolismo de SAM) e síntese de timidilato, os quais desempenham papéis importantes na estabilidade do DNA genômico (ROSATI et al., 2012)

O consumo excessivo de álcool pode também resultar em deficiências nutricionais devido às falhas na absorção intestinal e alterar vias metabólicas importantes, como o metabolismo do folato; consequentemente a metilação de genes com um potencial papel na carcinogênese pode ser comprometida (BOFFETTA et al., 2006). A metilação do DNA é um importante marcador epigenético na expressão do gene, na manutenção da integridade e estabilidade do DNA, em alterações cromossômicas e no desenvolvimento de mutações (HAMID, WANI e KAUR, 2009). A deficiência de folato pode levar a alterações na metilação do DNA, que podem resultar em superexpressão de protooncogenes e inibição de genes supressores de tumor, aumentando assim o risco para desenvolvimento de cânceres (HIYAMA et al., 2007; PEREZ-ORDEÑEZ et al., 2006). Pode também impedir o reparo por excisão de bases, o que contribui para o acúmulo de danos ao DNA (ROSATI et al., 2012)

Segundo Sailasree *et al.* (2011), o tabagismo e o etilismo são fatores de risco bem estabelecidos para o câncer oral, portanto apenas uma fração de fumantes e etilistas desenvolvem o câncer. Isto sugere que a etiologia do câncer oral está relacionada à suscetibilidade genética e interações entre fatores genéticos e ambientais (STURGIS & WEI, 2002; CHU et al., 2012).

Além dos fatores de risco exógenos, a suscetibilidade genética também é relatada como um fator de predisposição ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (LEEMANS et al., 2011). Segundo Perez-Ordeñez et al. (2006), tem-se observado um aumento na incidência de casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço entre mulheres e jovens sem fatores de risco conhecidos, sendo a maior frequência na cavidade oral e hipofaringe.

Alterações nas etapas do processo de reparo do DNA podem desempenhar um importante papel na carcinogênese ambiental, e a extensão dessas alterações podem ser responsáveis pela suscetibilidade ou resistência a agentes mutagênicos ambientais (ZHANG et al., 2000).

Os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, porém em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se uma variação é encontrada em uma frequência superior a 1% dentro de uma população, ela é considerada um polimorfismo (ROCHA et al., 2007). Indivíduos portadores de variantes genéticas de genes específicos que codificam enzimas envolvidas na quebra de agentes carcinogênicos, ou na codificação de proteínas de reparo do DNA, apresentam risco de desenvolvimento de câncer (FELLER & LEMMER, 2012).

Conforme descrito por Pai & Westra (2008), o risco pode estar relacionado a uma complexa interação entre exposição, ativação, desintoxicação e reparo do dano ao DNA. O conhecimento do perfil genético molecular permite uma resolução mais apurada do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com relação aos fatores de risco, patogênese e comportamento clínico (PAI & WESTRA, 2008).

1.5 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico e grupos metil (HOSSEINI-ASL et al, 2013). O gene MTHFR está localizado no cromossomo 1p36 (SAILASREE et al; 2011). A coenzima tetrahidrofolato (THF) é convertida para 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilTHF) e reduzida para 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) que participa da regeneração de metionina a partir de homocisteína, e está envolvida na síntese de nucleotídeos e metilação do DNA (YANG et al., 2005; WU et al., 2009; CRIDER et al., 2012; HOSSEINI-ASL et al, 2013). Sob condições dietéticas normais o folato absorvido é metabolizado no intestino e/ou no fígado (CRIDER et al., 2012). Os processos metabólicos dependentes de ácido fólico são influenciados pela ingestão de folato, vitamina B12 e B6 e também por polimorfismos na enzima MTHFR (BALUZ et al., 2002).

De acordo com a concentração SAM ocorrerá ativação ou inibição da MTHFR, que determinará se o folato intracelular será quimicamente reduzido e então utilizado para as vias de metilação ou mantido na forma não metilada para a síntese de

nucleotídeos (BALUZ et al., 2002). Esses processos, bem como as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido fólico, estão representados na **Figura 1**.

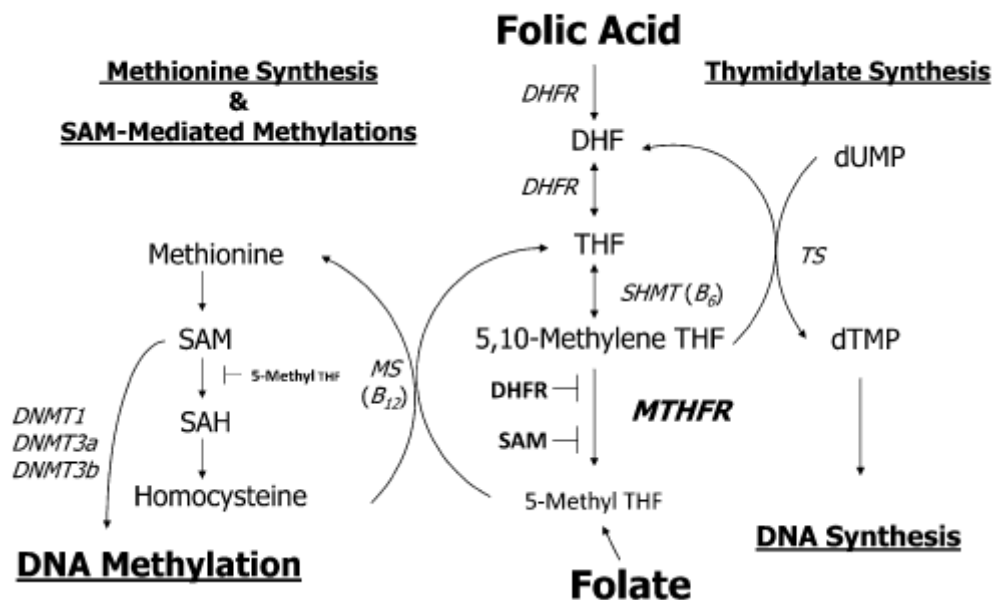


Figura 1: Metabolismo do ácido fólico. Processo de utilização do folato/ácido fólico para metilação do DNA e síntese de nucleotídeos. Fonte: CRIDER et al., 2012.

De acordo com Baluz et al. (2002) polimorfismos no gene MTHFR estão associados com o declínio dos níveis de folato reduzido (5-metilenotetrahidrofolato), o que pode conferir alterações na metilação do DNA e suscetibilidade ao câncer.

Conforme descrito por Linhart et al. (2009), existem três mecanismos pelos quais as alterações no metabolismo do folato podem contribuir com a carcinogênese: hipometilação do DNA e subsequente ativação de protooncogenes; erro de incorporação da uracila durante a síntese de DNA, que leva a instabilidade genômica; e aumento na desaminação de citosina nos sítios de metilação do DNA.

1.6 Cistationina β -sintetase (CBS)

A enzima CBS (Cistationina β -sintetase), também está envolvida no metabolismo do folato (GALBIATTI et al., 2012). O gene CBS está localizado no cromossomo 21q22.3 (DUTTA et al., 2005). Esta enzima possui um papel crucial na condensação de serina e homocisteína para formar cistationina, e participa da via de transulfuração de homocisteína, produzida durante o metabolismo de grupos metil (DUTTA et al., 2005). A deficiência enzimática provoca o aumento dos níveis plasmáticos de metionina e diminuição dos níveis de cisteína (ZHAO et al., 2012), levando a duas principais condições clínicas – hiperhomocisteinemia e homocistinúria (FRANCO et al., 1998; WU & LU, 2012), que estão correlacionados com várias doenças, dentre elas, doenças cardiovasculares e câncer (ZHAO et al., 2012; YAMASAKI-YASHIKI et al., 2012).

Em casos de hiperhomocisteinemia, como mecanismo de regulação a partir da via de transulfuração a homocisteína será convertida em cistationina, posteriormente em α cetoglutarato e cisteína, reação que requer a CBS dependente de piridoxal fosfato (B6) (BALUZ et al., 2002). A via de transulfuração é um mecanismo bioquímico que liga o metabolismo de metionina para a biossíntese de moléculas redox, como cisteína, glutatona e taurina. Deficiências nessa via induzem a produção de espécies reativas de oxigênio e halógenos; acúmulo de homocisteína; e respostas inflamatórias, contribuindo para doenças como aterosclerose e o desenvolvimento de tumor (ROSADO, SALVADOR e BONATTO, 2007).

A perda de expressão de CBS pode levar ao acúmulo de homocisteína (ZHAO et al., 2012), um produto da hidrólise intracelular de SAM (FRISO et al., 2005), que será reciclado para metionina na via de remetilação; a metionina age como doador de grupo metil para metilação do DNA, portanto a perda de expressão do gene resultará em descontrole da metilação. Deste modo a supressão de CBS por metilação do promotor pode interferir no metabolismo de grupos metil contribuindo para o desenvolvimento de câncer através do aumento de danos ao DNA por estresse oxidativo, prejudicando a capacidade antioxidante e desregulando a metilação do DNA (ZHAO et al., 2012).

1.7 Polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C e CBS 844ins68

Estudos apontam uma conexão entre suscetibilidade ao câncer oral e polimorfismos no gene MTHFR (SUPIC et al., 2011). Os polimorfismos C677T e A1298C estão relacionados à redução da atividade enzimática de MTHFR, e estão associados com o risco de desenvolvimento do câncer oral e também com pior prognóstico do paciente (MATTIA & TOFFOLI, 2008; SAILASREE et al., 2011).

No polimorfismo C677T – exon 4, códon 222 - uma troca de C para T no nucleotídeo 677 no gene MTHFR resulta na substituição de alanina por valina (SAILASREE et al; 2011) dentro do domínio catalítico N-terminal (SHRUBSOLE et al., 2004). Essa variação genética resulta na redução da atividade enzimática de MTHFR para formação de 5-metilTHF (CRIDER et al., 2012).

Segundo estudos realizados, indivíduos homozigotos (677TT) têm aproximadamente 30% de atividade da enzima, e heterozigotos (677CT) 65% (YANG et al., 2005; NEUMANN et al., 2005; SAILASREE et al; 2011). A redução da capacidade enzimática resulta no acúmulo de homocisteína no sangue e na urina, podendo levar ao desenvolvimento de retardo mental e doenças vasculares; o risco de câncer associado com polimorfismos neste gene pode ser modulado pela ingestão de folato (HAMID, WANI e KAUR, 2009).

Este polimorfismo tem sido associado ao risco aumentado para vários tipos de câncer, como o câncer de endométrio, de mama, de ovário, de esôfago, gástrico, e redução do risco para outros, como leucemia e câncer colorretal (HAMID, WANI e KAUR, 2009).

Segundo Tsai et al. (2011), a associação entre tabagismo e o genótipo C677T afeta significativamente a suscetibilidade ao câncer oral. Solomon et al. (2008), confirmou em seu estudo a associação do polimorfismo C677T com o risco aumentado para o câncer epidermóide de cabeça e pescoço. O genótipo 677TT combinado com a ingestão de grandes quantidades de álcool tem sido associado com o aumento do risco de câncer oral (SOLOMON et al., 2008; SUPIC et al., 2011). Segundo Zhuo et

al. (2012), a associação de homozigotos 677TT com o etilismo apresentou suscetibilidade elevada para CEO.

A associação do polimorfismo C677T com a ingestão de folato foi previamente estabelecida para vários tipos de câncer. Boccia et al. (2012) aponta que a ingestão inadequada de ácido fólico pode aumentar a suscetibilidade para o câncer epidermóide de cabeça e pescoço. Seus resultados sugerem que o genótipo TT associado à baixa ingestão de ácido fólico aumenta o risco de desenvolvimento da doença. Segundo Suzuki et al. (2007), indivíduos 677TT com ingestão adequada de ácido fólico apresentaram risco reduzido, embora não significativo estatisticamente, para esse tipo de câncer.

No polimorfismo A1298C – exon 7, códon 429 - ocorre uma transição de A para C na posição 1298, resultando na substituição de glutamato por alanina (PUT et al., 1998; NEUMANN et al., 2005) no domínio regulatório C-terminal (SHRUBSOLE et al., 2004). Neste polimorfismo a redução da atividade enzimática é menos severa, comparada ao polimorfismo C677T (MATTIA & TOFFOLI, 2008). Portadores do genótipo 1298CC (homozigotos) apresentam redução moderada da atividade da enzima (30-40%) (SAILASREE et al., 2011). No entanto, Friso et al. (2005) observou que A1298C, isoladamente, não prejudica a função de MTHFR de forma significativa suficiente para alterar o caminho de remetilação da homocisteína e os processos metilação. A literatura sugere que o polimorfismo C677T está localizado na base de ligação do cofator MTHFR, deste modo a atividade da enzima é mais prejudicada com relação ao polimorfismo A1298C (FRISO et al., 2005).

Esse polimorfismo foi relatado em estudos anteriores como preditor para carcinoma epidermóide de esôfago, linfoma maligno e leucemia aguda (CAO et al., 2010). Neumann et al. (2005) evidenciou redução do risco para câncer epidermóide de cabeça e pescoço em portadores do genótipo 1298CC. Os resultados de Zhuo et al. (2012) também mostram que esse genótipo possui papel preventivo para o câncer oral. Segundo Sailasree et al. (2011), A1298C pode ser um biomarcador útil para determinar a sobrevida de pacientes com câncer oral.

O polimorfismo CBS 844ins68 - exon 8 - apresenta uma inserção de 68 pares de bases no nucleotídeo 844 (GALBIATTI et al., 2010). Embora essa inserção não

resulte em alterações aparentes da atividade enzimática, as informações do mRNA fornecem evidências de que o alelo transportando a inserção é fracamente transcrito (FRANCO et al., 1998).

Segundo Galbiatti et al. (2010), esse polimorfismo está associado a alterações na metilação do DNA e o desenvolvimento de câncer. Zhao et al. (2012), evidenciou que em tumores gastrointestinais o gene CBS atua como supressor tumoral devido a sua hipermetilação. Em pacientes com câncer de cavidade oral, o polimorfismo 844ins68 foi associado com tumor primário e menor sobrevida (GALBIATTI et al., 2010).

Vários trabalhos mostram a relação do polimorfismo 844ins68 com outras doenças, como Dutta et al. (2005) que encontrou relação desse polimorfismo com retardo mental; associação com esquizofrenia (GOLIMBET et al., 2009) e em pacientes com anemia falciforme os resultados de Jacob, Bastos e Bonini-Domingos (2011) apontam que a inserção de 68pb está relacionada com eventos vasocclusivos.

1.8 Frequências dos genótipos nas populações

Neumann et al. (2005), realizou um estudo dos polimorfismos C677T e A1298C no Texas envolvendo 537 casos e 545 controles. Os genótipos CT e TT estavam presentes em 45,5% e 6,5% dos casos; 39,6% e 9,4% dos controles; para os genótipos AC e CC as frequências observadas foram, 37% e 1,9%; 44% e 5,7% para casos e controles.

Na cidade de Belgrado – Sérvia, Supic et al. (2011), analisou 96 casos de câncer oral e 161 controles. Para o polimorfismo C677T a frequência dos genótipos CT e TT nos casos analisados foram de 33% e 15%; nos controles a frequência foi de 41% e 10%.

Um estudo realizado no Paquistão incluindo 872 indivíduos saudáveis analisou a frequência genotípica dos polimorfismos C677T, A1298C e CBS. Os resultados para os genótipos CT e TT foram 26,1% e 2,5%; para os genótipos AC e CC foram 48,7%

e 30,5%; e 13,2% e 0,34% para heterozigotos e homozigotos CBS, respectivamente (YAKUB et al., 2012).

Em uma pesquisa realizada na Índia envolvendo 130 casos e 139 controles, foi analisada a frequência dos polimorfismos C677T e A1298C. A frequência dos genótipos CT e TT foram 21,2% e 0,7%; 7,9% e 1,0%. Os genótipos AC e CC apresentaram 56,9% e 14,6%; 42,4 e 24,5% para casos e controles (SAILASREE et al., 2011).

Vairaktaris et al. (2006), encontrou entre gregos e alemães as frequências de 69,1% 677CT e 5,5% 677TT nos casos e 54,2% 677CT e 8,3% 677TT nos controles, analisando um total de 220 indivíduos.

No Japão foram analisados 237 casos e 711 controles para os polimorfismos C677T e A1298C. Os genótipos CT e TT apresentaram frequências de 47,7% e 15,2% nos casos, e 46,6% e 18% nos controles; as frequências observadas para os genótipos AC e CC nos casos foram 33,3% e 3,4% e nos controles 31,2% e 4,4% (SUZUKI et al., 2007).

Numa análise envolvendo 200 brasileiros (100 casos e 100 controles), Rodrigues et al. (2010) encontrou as frequências de 43% e 13% (casos) e 40% e 14% (controles) para o polimorfismo C677T.

Também no Brasil, um estudo realizado por Galbiatti et al. (2010) na cidade de São Paulo, entre 322 casos e 531 controles para o polimorfismo CBS foram detectados 17,5% heterozigotos e 2,5% homozigotos no grupo caso, e 14,6% heterozigotos e 2,0% homozigotos no grupo controle.

Diante das altas taxas de incidência de câncer oral na população brasileira apontados pelo INCA, e da possibilidade de utilizar esses polimorfismos como biomarcadores, essa pesquisa foi realizada a fim de contribuir com a saúde pública capixaba.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar a associação dos polimorfismos MTHFR C677T (rs1801133), MTHFR A1298C (rs1801131) e CBS 844ins68 com o carcinoma epidermóide oral.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as frequências genotípicas e alélicas dos três polimorfismos na população do Espírito Santo;
- Analisar a associação do tipo caso-controle, objetivando identificar marcadores genéticos correlacionados com o CEO;
- Avaliar a associação dos polimorfismos estudados com parâmetros clinicopatológicos;
- Comparar as frequências genotípicas e alélicas observadas com as descritas na literatura, visando contribuir para um melhor conhecimento da estrutura populacional do Espírito Santo.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

Foram incluídos neste estudo casos de carcinoma epidermóide oral atendidos no Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca do Hospital Santa Rita de Cássia – ES. Como grupo controle, indivíduos voluntários sem câncer.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde (CIAS), registrado sob o número 318/2011 e CCS-UFES número 036/10 (**Anexo 1**). O consentimento informado foi obtido, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10 de outubro de 1996.

Os participantes foram submetidos a uma entrevista através de questionário específico; a autorização para a pesquisa foi obtida através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**).

3.2 Análise molecular

3.2.1 Amostras

Os casos foram selecionados seguindo os critérios de inclusão: indivíduos de ambos os gêneros, grupos étnicos ou faixa etária, com diagnóstico clínico de carcinoma epidermóide da cavidade oral, que ainda não haviam iniciado tratamentos antineoplásicos de quimioterapia/radioterapia, ou cirurgias prévias, cujo tratamento inicial foi terapia cirúrgica. No total foram incluídos 101 pacientes. Como grupo controle foram selecionados 102 indivíduos sem câncer, sendo pareado com cada caso por sexo e idade (com até cinco anos para mais ou para menos).

As amostras foram obtidas no período de setembro de 2011 a janeiro de 2013 através de raspagem da face interna das bochechas com escovas citológicas estéreis através de fricção por aproximadamente 30 segundos e acondicionadas em

microtubo contendo 200µl de TES (10mM Tris-HCl, pH7,6; 1mM EDTA e 0,6% de dodecil sulfato de sódio); ou coleta de 5mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante EDTA. Todo o material coletado foi mantido em refrigerador à temperatura de 2 a 8°C.

3.2.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo caseiro utilizando PC9 (Phenol Chloroform pH9). O DNA proveniente de sangue periférico foi ressuspendido em 70µL de LoTE (Low Tris-EDTA), e em 20µL para DNA de células da mucosa bucal.

3.2.3 Genotipagem

Para a detecção dos polimorfismos no gene MTHFR foi utilizada a técnica PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Inicialmente o DNA é submetido à técnica de PCR, permitindo a amplificação do número de fragmentos da região de interesse que contém o códon onde se localizam os referidos polimorfismos. Posteriormente os produtos amplificados são submetidos à clivagem com a enzima de restrição específica.

No polimorfismo C677T, a substituição de C→T no nucleotídeo 677 cria um sítio de restrição HinfI. O produto de PCR (198pb) com o alelo T é digerido em dois fragmentos (175 e 23pb), enquanto o produto com alelo selvagem (C) não é digerido (**Figura 2**).

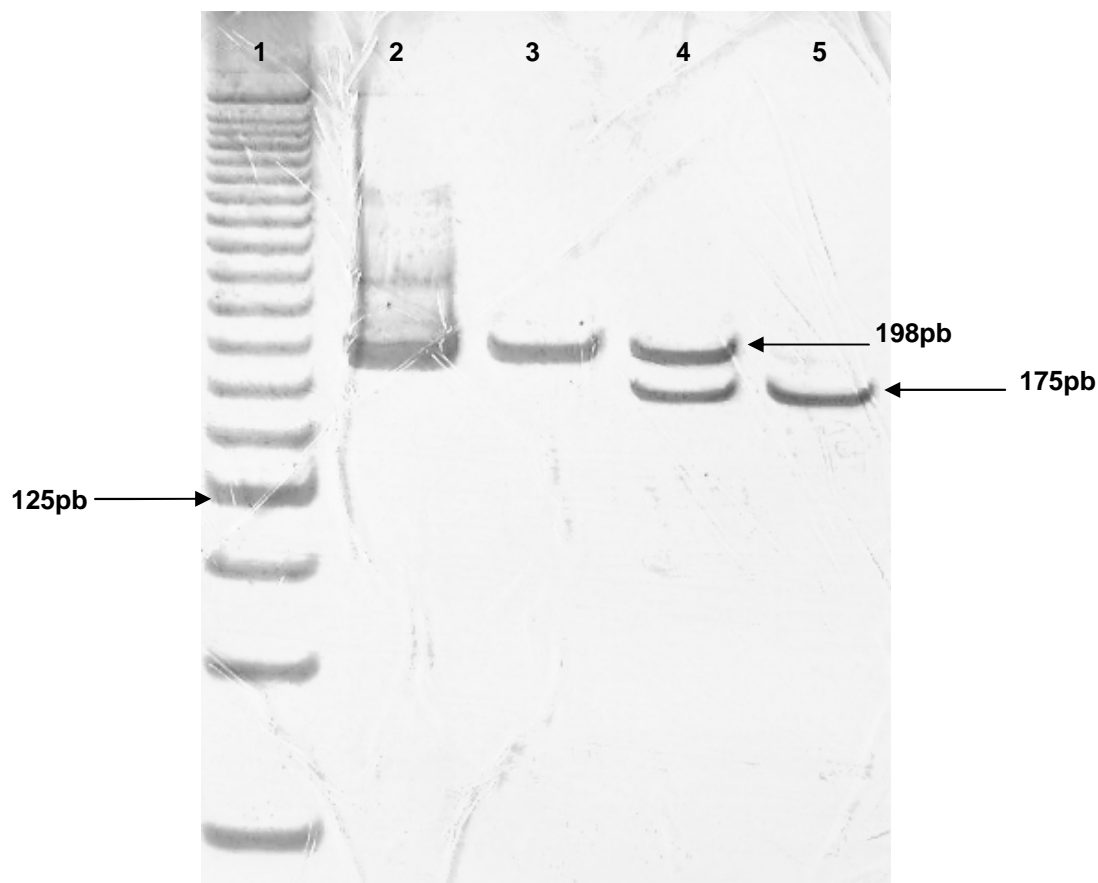


Figura 2: Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo MTHFR C677T. 1: Ladder; 2: Produto de PCR; 3: Homozigoto selvagem; 4: Heterozigoto; 5: Homozigoto variante. A banda de 23pb não é visualizada neste gel.

No polimorfismo A1298C, a substituição de A→C no nucleotídeo 1298 elimina um sítio de restrição MbOII. O produto de PCR (163pb) com o alelo A (selvagem) é digerido em cinco fragmentos (56, 31, 30, 28 e 18pb), enquanto o produto com alelo C (variante) apresenta quatro fragmentos digeridos (84, 31, 30 e 18pb) (**Figura 3**).

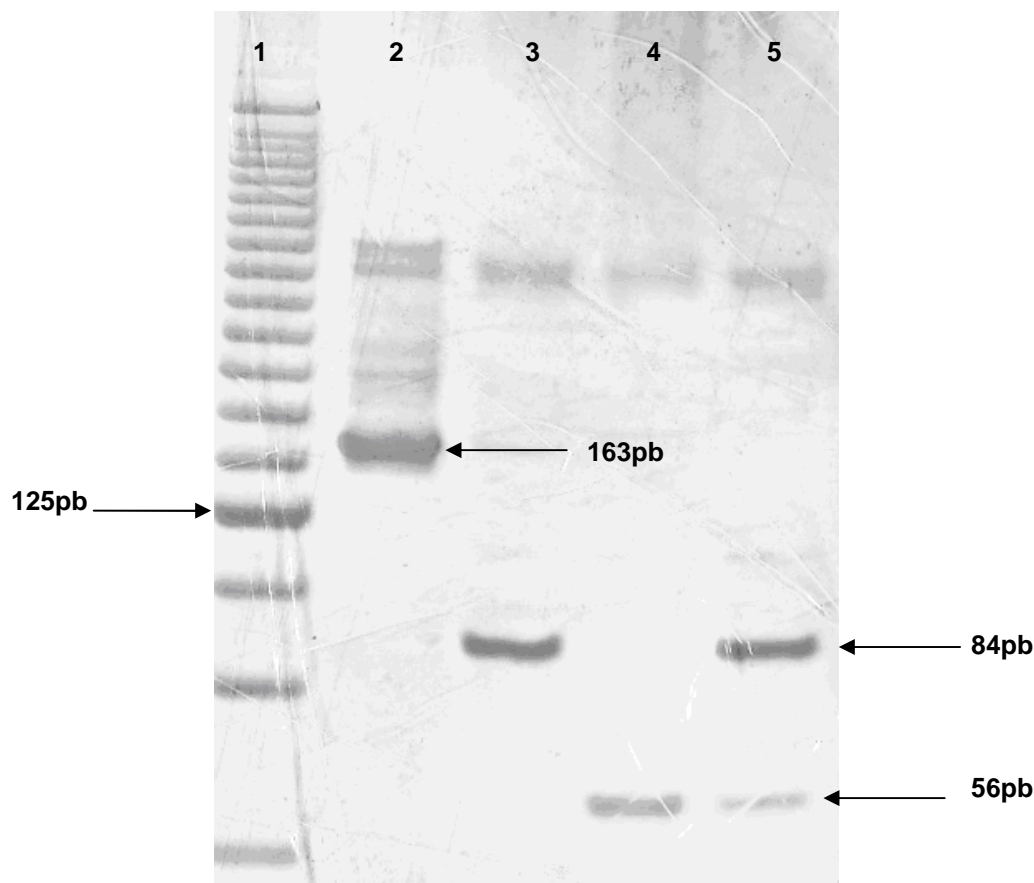


Figura 3: Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo MTHFR A1298C. 1: Ladder; 2: Produto de PCR; 3: Homozigoto variante; 4: Homozigoto selvagem; 5: Heterozigoto. As bandas de 18, 28, 30 e 31pb não são visualizadas neste gel.

A detecção do polimorfismo no gene CBS foi realizada utilizando-se apenas a técnica de PCR simples, que permite a verificação da presença ou ausência do polimorfismo. Na análise observa-se uma banda de 171pb (alelo selvagem), enquanto no alelo variante, que possui uma inserção de 68pb, evidencia-se uma banda de 239pb (**Figura 4**).

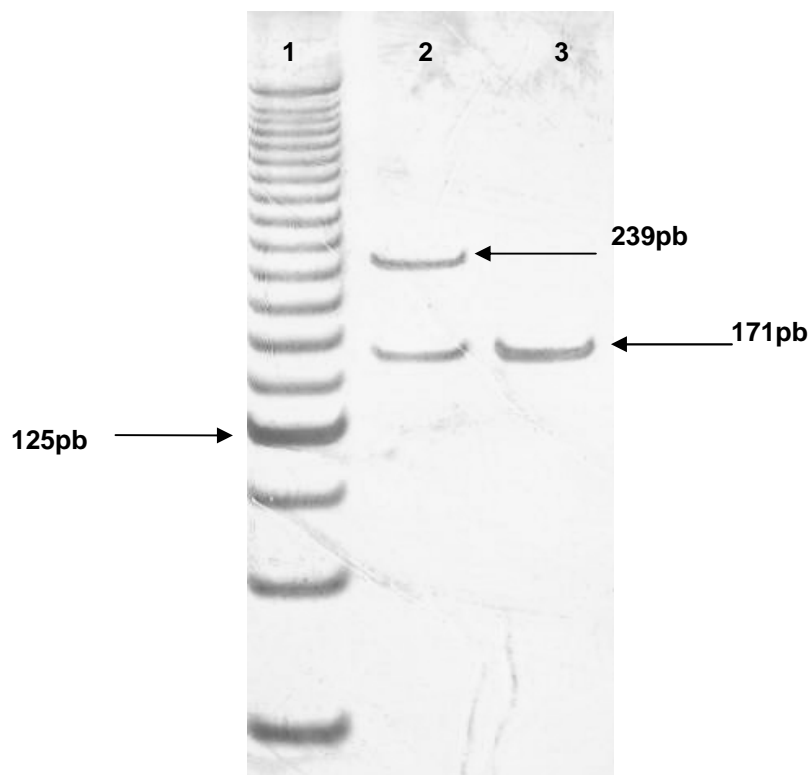


Figura 4: Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Polimorfismo CBS 844ins68. 1: Ladder; 2: Heterozigoto; 3: Homozigoto selvagem.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), as temperaturas de anelamento, as enzimas de restrição e os produtos gerados pós digestão enzimática encontram-se no **Quadro 3**.

Quadro 3: Sequências dos *primers*, temperatura de anelamento (TA) da PCR, enzima de restrição utilizada e produtos gerados pós digestão para cada polimorfismo avaliado.

Gene	Primer 5' – 3'	TA (°C)	Enzima de restrição	Produtos gerados (pb)	Ref.
MTHFR	F 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3' R 5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'	65	Hinf I	Alelo normal: 198 pb Alelo variante: 175 + 23pb	Shrubsole et al., 2004.
	F 5' CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3' R 5' CACTTTGTGACCATTCGGGTTTG 3'	59	MbOII	Alelo normal: 56+31+30+28+18 pb Alelo variante: 84+31+30+18 pb	Put et al., 1998.
CBS	F 5' GTTGTTAACGGCGGTATTGG 3' R 5' GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT 3'	56	-----	Alelo normal: 171 pb Alelo variante: 239 pb	Dutta et al., 2005.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 8%, corado com solução de nitrato de prata (0,1%), para visualização e análise dos resultados.

3.3 Análise estatística

As frequências genótípicas foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Foram utilizados para análise de diferença populacional o teste qui-quadrado e o teste de Fischer, a confirmação foi obtida pelo teste de Lilliefors (considerado significativo quando $p < 0.05$). A regressão logística multivariada foi utilizada para obter o odds ratio (OR) e intervalos de confiança (IC 95%). Os cálculos estatísticos foram realizados através do software Epi Info® v3.4.3.

4. RESULTADOS

4.1 Descrição das populações do estudo:

Foram incluídos neste estudo 203 indivíduos (101 casos e 102 controles), a média de idade dos casos foi de 58.0 anos e de 55.9 anos nos controles (mediana = 56.0 e 55.0 anos respectivamente), sendo 40 do sexo feminino (20 casos e 20 controles) e 163 do sexo masculino (81 casos e 82 controles). No grupo casos a prevalência do sexo masculino foi de 80,2% e destes 82,7% eram tabagistas e 66,7% etilistas. No sexo feminino 35% eram tabagistas e 60% etilistas. No total 74 (73,3%) indivíduos informaram ser tabagistas e 69 (68,3%) etilistas; dos 101 pacientes, 59 alegaram os dois hábitos associados e 18 informaram nunca ter fumado ou ingerido bebida alcoólica. A população controle foi pareada ao grupo de pacientes nas características sexo e idade, como os dados sobre tabagismo e etilismo nos controles eram parciais essas características não foram incluídas na análise. A análise das características demográficas não apresentou diferença estatística significativa entre casos e controles (**Tabela 1**).

Tabela 1: Análise de risco para sexo e idade nos grupos caso/controle.

Características demográficas	ANÁLISE DE RISCO						p
	Total		Caso		Controle		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Gênero							
Feminino	40	19,7	20	19,8	20	19,6	0.972
Masculino	163	80,3	81	80,2	82	80,4	
Faixa etária, anos							
≤ 55	103	50,7	47	46,5	56	54,9	0.233
> 55	100	49,3	54	53,5	46	45,1	
Total	203	100,0	101	49,8	102	50,2	

4.2 Análise das frequências genotípicas e alélicas dos casos e controles estudados:

Na análise do polimorfismo MTHFR C677T foram detectados dentre os casos 50 (49,5%) homozigoto selvagem (CC), 45 (44,6%) heterozigoto (CT) e seis (5,9%) homozigoto variante (TT); dentre os controles, 50 CC (49,0%), 41 CT (40,2%) e 11 TT (10,8%). Para o polimorfismo MTHFR A1298C foram detectados 60 (59,4%) homozigoto selvagem (AA), 36 (35,6%) heterozigoto (AC) e cinco (5,0%) homozigoto variante (CC), dentre os casos; e 53 AA (52,0%), 44 AC (43,1%) e 5 CC (4,9%), dentre os controles. No polimorfismo CBS 844ins68 foram evidenciados nos casos, 76 (75,2%) homozigoto selvagem (WT/WT), 24 (23,8%) heterozigoto (WT/ins) e um (1,0%) homozigoto variante (ins/ins); e nos controles, 87 WT/WT (85,3%), 14 WT/ins (13,7%) e um ins/ins (1,0%) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Frequência genotípica dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68.

Características	Frequência genotípica						Total
	Homoz selvagem		Heterozigoto		Homoz variante		
	n	f	n	f	n	f	
MTHFR C677T							
Geral	100	0,493	86	0,424	17	0,084	203
Casos	50	0,495	45	0,446	6	0,059	101
Controles	50	0,490	41	0,402	11	0,108	102
MTHFR A1298C							
Geral	113	0,557	80	0,394	10	0,049	203
Casos	60	0,594	36	0,356	5	0,050	101
Controles	53	0,520	44	0,431	5	0,049	102
CBS 844ins68							
Geral	163	0,803	38	0,187	2	0,010	203
Casos	76	0,752	24	0,238	1	0,010	101
Controles	87	0,853	14	0,137	1	0,010	102

No grupo de pacientes a frequência alélica foi de 28,2%, 22,8% e 12,9% para os alelos polimórficos; para os alelos selvagens foi de 71,8%, 77,2% e 87,1%, respectivamente. Nos controles, as respectivas frequências foram 30,9%, 26,5% e 7,8% e 69,1%, 73,5% e 92,2%. Os dados referentes aos pacientes e controles são apresentados na **Tabela 3**. De acordo com os referidos dados, as frequências genotípicas observadas em MTHFR C677T, MTHFR A1298C e CBS 844ins68 estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, em ambos os grupos. Em nenhuma das comparações realizadas houve diferença estatisticamente significativa, o que permite considerar que as amostras estudadas foram obtidas de populações em equilíbrio genético.

Tabela 3: Frequência alélica dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68.

Características	Frequência alélica		Hardy-Weinberg	
	Selvagem	Variante	χ^2	p
	f	f		
MTHFR C677T				
Geral	0,704	0,296	0.061	0.805
Casos	0,718	0,282	1.006	0.316
Controles	0,691	0,309	0.348	0.555
MTHFR A1298C				
Geral	0,754	0,246	0.766	0.381
Casos	0,772	0,228	0.018	0.893
Controles	0,735	0,265	1.193	0.275
CBS 844ins68				
Geral	0,897	0,103	0.017	0.896
Casos	0,871	0,129	0.357	0.550
Controles	0,922	0,078	0.260	0.610

4.3 Análise de suscetibilidade genética

A análise de risco não demonstrou correlação entre os genótipos estudados (nos grupos caso/controle) e a presença de câncer oral (**Tabela 4**).

Tabela 4: Análise de risco dos polimorfismos C677T, A1298C e 844ins68 nos grupos caso/controle.

Características genéticas	ANÁLISE DE RISCO						p
	Total		Caso		Controle		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
MTHFR C677T							
CC	100	49,3	50	49,5	50	49,0	0.438
CT	86	42,4	45	44,6	41	40,2	
TT	17	8,4	6	5,9	11	10,8	
CT+TT	103	50,7	51	50,5	52	51,0	0.945
MTHFR A1298C							
AA	113	55,7	60	59,4	53	52,0	0.541
AG	80	39,4	36	35,6	44	43,1	
GG	10	4,9	5	5,0	5	4,9	
AG+GG	90	44,3	41	40,6	49	48,0	0.286
CBS 844ins68							
WT/WT	163	80,3	76	75,2	87	85,3	0.072
WT/ins+ins/ins	40	19,7	25	24,8	15	14,7	
Total	203	100,0	101	49,8	102	50,2	

4.4 Análise das características genéticas x clinicopatológicas

4.4.1 Análise de risco em relação aos genótipos do polimorfismo MTHFR C667T:

Na análise de risco em relação às características clinicopatológicas no grupo casos, observou-se que o polimorfismo C677T está relacionado com linfonodos negativos; os resultados encontrados apontam que a combinação dos genótipos CT+TT atuam como fator de proteção ($p = 0.022$) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Análise do polimorfismo C677T x características clinicopatológicas.

Características cl clinicopatológicas	MTHFR C677T											
	Total		CC		CT		TT		p	CT+TT		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	
Estádio												
I	12	11,9	5	10,0	5	11,1	2	33,3	0.371	7	13,7	0.440
II	13	12,9	7	14,0	6	13,3	0	0,0		6	11,8	
III	22	21,8	14	28,0	8	17,8	0	0,0		8	15,7	
IV	54	53,5	24	48,0	26	57,8	4	66,7		30	58,8	
I+II	25	24,8	12	24,0	11	24,4	2	33,3	0.501	13	25,5	0.311
Tamanho do tumor (T)												
T1, T2	34	33,7	17	34,0	15	33,3	2	33,3	0.926	17	33,3	0.657
T3	17	16,8	10	20,0	6	13,3	1	16,7		7	13,7	
T4	50	49,5	23	46,0	24	53,3	3	50,0		27	52,9	
Linfonodos (N)												
Negativo	50	49,5	19	38,0	28	62,2	3	50,0	0.062	31	60,8	<u>0.022</u>
Positivo	51	50,5	31	62,0	17	37,8	3	50,0		20	39,2	
Grau de diferenciação												
Bem diferenciado	25	24,8	10	20,0	15	33,3	0	0,0	0.192	15	29,4	0.238
Moderadamente	29	28,7	12	24,0	14	31,1	3	50,0		17	33,3	
Pouco diferenciado	5	5,0	4	8,0	1	2,2	0	0,0		1	2,0	
N/a*	42	41,6	24	48,0	15	33,3	3	50,0		18	35,3	
Total	101	100,0	50	49,5	45	44,6	6	5,9		51	50,5	

N/a*: dados indisponíveis.

A análise multivariada (IC 95%), que considerou o tamanho do tumor em seu modelo, revela que a combinação de genótipos CT+TT oferece um risco de comprometimento linfonodal três vezes menor que o genótipo CC ($p = 0.012$) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Análise multivariada do polimorfismo MTHFR C677T.

Linfonodos (N)		
Características	Análise multivariada	
	OR (IC 95%)	p
Tamanho do tumor (T)		
T1, T2	1	
T3	3.07 (0.87-10.87)	0.083
T4	6.46 (2.32-17.95)	<0.001
MTHFR C677T		
CC	1	
CT+TT	0.32 (0.13-0.77)	0.012

4.4.2 Análise de risco em relação aos genótipos do polimorfismo MTHFR A1298C:

Foi observado que o polimorfismo A1298C está relacionado com o grau de diferenciação do tumor. A combinação dos genótipos AC+CC foi mais frequente nos tumores bem diferenciados, já o genótipo AA teve uma maior frequência observada nos tumores moderadamente ou pouco diferenciados ($p = 0.007$) (**Tabela 7**).

Tabela 7: Análise do polimorfismo A1298C x características clinicopatológicas.

Características cl clinicopatológicas	MTHFR A1298C											
	Total		AA		AC		CC		p	AC+CC		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	
Estádio												
I	12	11,9	6	10,0	6	16,7	0	0,0	0.923	6	14,6	0.890
II	13	12,9	8	13,3	4	11,1	1	20,0		5	12,2	
III	22	21,8	14	23,3	7	19,4	1	20,0		8	19,5	
IV	54	53,5	32	53,3	19	52,8	3	60,0		22	53,7	
I+II	25	24,8	14	23,3	10	27,8	1	20,0	0.979	11	26,8	0.868
Tamanho do tumor (T)												
T1, T2	34	33,7	22	36,7	11	30,6	1	20,0	0.930	12	29,3	0.726
T3	17	16,8	10	16,7	6	16,7	1	20,0		7	17,1	
T4	50	49,5	28	46,7	19	52,8	3	60,0		22	53,7	
Linfonodos (N)												
Negativo	50	49,5	30	50,0	19	52,8	1	20,0	0.386	20	48,8	0.904
Positivo	51	50,5	30	50,0	17	47,2	4	80,0		21	51,2	
Grau de diferenciação												
Bem diferenciado	25	24,8	8	13,3	14	38,9	3	60,0	0.037	17	41,5	0.007
Moderadamente	29	28,7	18	30,0	10	27,8	1	20,0		11	26,8	
Pouco diferenciado	5	5,0	5	8,3	0	0,0	0	0,0		0	0,0	
N/a*	42	41,6	29	48,3	12	33,3	1	20,0		13	31,7	
Total	101	100,0	60	59,4	36	35,6	5	5,0		41	40,6	

N/a*: dados indisponíveis.

4.4.3 Análise de risco em relação aos genótipos do polimorfismo CBS 844ins68:

Os resultados encontrados na análise do polimorfismo 844ins68 não foram estatisticamente significantes (**Tabela 8**).

Tabela 8: Análise do polimorfismo 844ins68 x características clinicopatológicas.

Características epidemiológicas e genéticas	Total		CBS 844ins68				p
			WT		ins		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Estádio							
I	12	11,9	8	10,5	4	16,0	0.906
II	13	12,9	10	13,2	3	12,0	
III	22	21,8	17	22,4	5	20,0	
IV	54	53,5	41	53,9	13	52,0	
I+II	25	24,8	18	23,7	7	28,0	0.903
Tamanho do tumor (T)							
T1, T2	34	33,7	26	34,2	8	32,0	0.959
T3	17	16,8	13	17,1	4	16,0	
T4	50	49,5	37	48,7	13	52,0	
Linfonodos (N)							
Negativo	50	49,5	40	52,6	10	40,0	0.273
Positivo	51	50,5	36	47,4	15	60,0	
Grau de diferenciação							
Bem diferenciado	25	24,8	19	25,0	6	24,0	0.462
Moderadamente	29	28,7	22	28,9	7	28,0	
Pouco diferenciado	5	5,0	5	6,6	0	0,0	
N/a*	42	41,6	30	39,5	12	48,0	
Total	101	100,0	76	75,2	25	24,8	

N/a*: dados indisponíveis.

5. DISCUSSÃO

A análise das características epidemiológicas (sexo e idade), não apresentou diferença estatisticamente significativa entre casos ($n = 101$) e controles ($n = 102$). Contudo, observamos que o número de casos de câncer oral em indivíduos do sexo masculino foi quatro vezes maior que no sexo feminino. Segundo dados do INCA (2012), o câncer oral é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino com idade acima de 40 anos. O fato da doença se apresentar a partir da quarta década de vida, pode ser explicado pelo acúmulo de mutações ao longo de anos de exposição aos fatores de risco (ALMEIDA et al., 2011). Geralmente a exposição das mulheres aos fatores de risco da doença ocorre mais tardiamente ou em menor quantidade; tabaco e álcool são apontados como os principais (OLIVEIRA et al., 2006). Porém, nos últimos anos a incidência entre as mulheres tem aumentado, provavelmente pela disseminação entre elas do hábito de fumar (DANIEL et al., 2006) e ingerir bebidas alcoólicas (BRENER et al., 2007). O aumento da incidência em indivíduos mais jovens tem sido atribuído ao aumento da prevalência de infecções por HPV (GALBIATTI et al., 2012).

Em nossa casuística observamos mais tabagistas (73,3%), que etilistas (68,3%), embora os dois hábitos tenham sido frequentes na população estudada. Vários estudos demonstram prevalências elevadas de pacientes tabagistas e/ou etilistas. Rodrigues et al. (2010), também obteve um maior número de tabagistas (88%) em relação aos etilistas (77%), ($n=100$). No trabalho de Yang et al. (2005) observou-se o contrário, 64,2% tabagistas e 87,9% etilistas ($n=165$). A combinação desses dois hábitos multiplica o risco de desenvolvimento de câncer oral (GALBIATTI et al., 2012; INCA, 2013).

No presente estudo as frequências genotípicas encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos analisados. O alelo variante para o polimorfismo C677T esteve presente em 28,2% dos casos e em 30,9% dos controles. Esse polimorfismo apresenta grande variação étnica e geográfica. No estudo de Rodrigues et al. (2010), realizado no estado de São Paulo, o alelo variante foi evidenciado em 3,5% dos casos e 3,4% dos controles; no Texas o alelo variante estava presente em 29,2% dos casos e controles (NEUMANN et al., 2005); entre gregos e alemães o alelo variante foi detectado em 40% dos casos e 35,4% dos

controles (VAIRAKTARIS et al., 2006). Percebe-se que dentro do mesmo país há variações entre estados. A etnia dos envolvidos em nossa casuística não foi considerada devido à grande miscigenação do povo brasileiro. Segundo Rocha et al. (2007) diferenças genéticas podem conferir proteção ou risco para o desenvolvimento do câncer em populações de ancestralidades diferentes. No entanto, a estratificação de grupos por etnia é bastante complexa, pois a cor da pele e a região de origem não são suficientes para diferenciar uma população miscigenada.

No polimorfismo A1298C o alelo variante esteve presente em 22,8% dos casos e em 26,5% dos controles. Nos Estados Unidos o alelo variante para esse polimorfismo foi detectado em 20,4% e 27,7% para casos e controles, respectivamente (NEUMANN et al., 2005). Em contraste com esses resultados, na China o alelo variante foi detectado em apenas 2,8% dos casos e em 2,2% dos controles (CAO et al., 2010); no Paquistão a variante C foi encontrada em 5,5% da população normal (YAKUB et al., 2012).

Na análise do polimorfismo CBS 844ins68 o alelo variante foi identificado em 12,9% dos casos e 7,8% dos controles. Galbiatti et al. (2010), detectou o alelo variante desse polimorfismo em 16,9% dos casos e 17,2% dos controles, em uma pesquisa realizada no município de São Paulo.

Em contraste com outros estudos, nossa análise de risco nos grupos caso/controle não demonstrou correlação entre os genótipos estudados e o câncer oral. Segundo Neumann et al. (2005), indivíduos com o genótipo 677TT apresentam um menor risco de desenvolvimento de câncer oral. Sailasree et al. (2011) verificou que o polimorfismo C677T está associado com a predisposição do câncer oral na Índia. Sua pesquisa mostrou que indivíduos CT e TT apresentaram um menor risco para desenvolvimento de CEO, comparado aos indivíduos CC. Vairaktaris et al. (2006) observou associação do polimorfismo C677T com o aumento do risco para CEO. Em conformidade com nossos resultados, Boccia et al. (2012) não encontrou relação de A1298C com o risco para câncer epidermóide de cabeça e pescoço; Suzuki et al. (2007) também analisou o risco dos polimorfismos C677T e A1298C para esse tipo de câncer, separadamente e em conjunto, não evidenciando nenhuma associação.

Galbiatti et al. (2010), também não encontrou correlação entre o polimorfismo CBS 844ins68 e o câncer epidermóide de cabeça e pescoço.

Nossa análise de risco em relação às características clinicopatológicas no grupo de pacientes mostrou que o polimorfismo C677T está relacionado com linfonodos negativos; nossos resultados apontam que a combinação dos genótipos CT+TT atuam como fator de proteção ($p = 0,022$). Na análise multivariada, em que consideramos o tamanho do tumor, a combinação dos genótipos CT+TT revelou que o risco de comprometimento de linfonodos é três vezes menor que no genótipo CC. Supic et al. (2011), Rodrigues et al. (2010) e Sailasree et al. (2011) não encontraram associação estaticamente significativa entre comprometimento de linfonodos com o polimorfismo C677T.

Nossos resultados sugerem fator protetor para os genótipos CT e TT. Essa proteção pode ser devido à diminuição de mutações no DNA por erros de incorporação de nucleotídeos durante a duplicação e por redução da eficiência de metilação. A enzima com atividade reduzida aumentaria a concentração intracelular de 5,10-metilenotetrahidrofolato acarretando no aumento da disponibilidade de timina que leva a uma maior estabilidade do DNA por reduzir a chance de incorporação errada de uracila (CHEN et al., 2001; PAZ et al., 2002; SOHN et al., 2004). Experimentos em ratos confirmaram a diminuição de metilação do DNA quando MTHFR tem atividade reduzida. A baixa metilação também pode ser um fator protetor por diminuir as chances de hipermetilação de regiões promotoras em supressores tumorais (CHEN et al., 2001). Os protooncogenes promovem crescimento, diferenciação e proliferação celular, enquanto genes supressores de tumor, o inibem. Mutações em protooncogenes podem resultar em multiplicações excessivas, neste caso a metilação também atuaria como fator protetor, e em supressores de tumor podem ser inativados contribuindo para a formação do câncer (BALUZ et al., 2002). A disponibilidade de folato pode afetar a capacidade de manter padrões de metilação do DNA em células em replicação (CRIDER et al., 2012). Segundo Baluz et al. (2002) células neoplásicas de origem epitelial necessitam de folato reduzido para sua replicação. Como os genótipos variantes (CT e TT) apresentam redução da atividade enzimática, a disponibilidade de folato reduzido fica comprometida, fato que pode explicar o fator protetor observado nessas variantes por diminuir a capacidade replicativa das células neoplásicas.

No estudo realizado por Tsai et al. (2011) em Taiwan com 620 indivíduos (caso /controle), os resultados obtidos revelaram que o alelo 677T foi mais frequente nos controles do que nos pacientes com câncer oral, assim como os pacientes com os genótipos CT e TT apresentaram um menor risco de metástase. Existem evidências de que baixos níveis de folato estão associados com a diminuição da metilação global do DNA, o que pode ter relação com o aumento do risco de câncer (CRIDER et al., 2012). No entanto, quando a ingestão de ácido fólico é suficiente, os indivíduos portadores dos genótipos variantes podem ter o risco reduzido devido a maior disponibilidade de 5,10metilenoTHF para a conversão de uracila em timidina para a síntese de DNA (BAILEY e GREGORY, 1999).

Detectamos na análise de risco para o polimorfismo A1298C que este está relacionado com o grau de diferenciação do tumor. A combinação dos genótipos AC+CC foi mais frequente nos tumores bem diferenciados ($p = 0,007$), que pode estar relacionado com melhor prognóstico, enquanto o genótipo AA teve uma maior frequência nos tumores moderadamente ou pouco diferenciados.

Diante do exposto, nossos dados mostram uma associação entre os genótipos AC + CC e os tumores bem diferenciados que, teoricamente, seriam de melhor prognóstico para o paciente. Entretanto, não é consenso na literatura que o grau de diferenciação tumoral seja um parâmetro para avaliação de prognóstico isolado. O comportamento biológico do CEO é incerto, a literatura sugere fatores que podem influenciar o prognóstico. Esses fatores podem estar relacionados ao paciente (idade, sexo, raça, condições sócio-econômicas e hábitos, como tabagismo e etilismo), ao tumor (sítio, estágio, espessura do tumor, histopatologia e expressão de marcadores moleculares) e ao tratamento (tipo de tratamento, terapia adjuvante) (MONTORO et al., 2008).

A diferença entre comportamentos biológicos relacionados a localizações anatômicas distintas representa dificuldade para que uma classificação com base apenas nos dados histopatológicos possua associação positiva com prognóstico, recorrência e sobrevida. No entanto, as classificações histopatológicas podem prover fatores prognósticos suplementares a fim de otimizar o valor do estadiamento TNM e auxiliar na escolha terapêutica (LOURENÇO et al., 2007).

Em geral pacientes com maior estágio TNM apresentam um pior prognóstico. Porém, há casos de tumores primários não detectáveis clinicamente que exibem maior agressividade, metástases regionais precoces e morte. Por outro lado, alguns tumores em estágios avançados apresentam retardo de metástases, e pós-tratamento os pacientes tem uma maior sobrevida livre de doença (KADEMANI et al., 2005). Kademani et al. (2005) evidenciou em seu estudo que a probabilidade do carcinoma pouco diferenciado apresentar pior prognóstico é maior comparada aos carcinomas moderadamente ou bem diferenciados.

O polimorfismo A1298C, em comparação com C677T, é bem menos caracterizado na literatura, mas é relatada sua associação com menor risco para alguns cânceres. Numa análise envolvendo 1082 indivíduos, a redução do risco de câncer de cabeça e pescoço foi observada para os genótipos AC e CC (NEUMANN et al., 2005). Em câncer oral o genótipo CC desempenha um papel preventivo, segundo metanálise realizada por Zhuo et al. (2012).

Em indivíduos 1298CC a atividade enzimática de MTHFR é reduzida em aproximadamente 30-40% (SAILASREE et al., 2011). Conforme observado no polimorfismo 677T, a redução da atividade enzimática irá aumentar a concentração de 5,10-metilenotetrahidrofolato, reduzindo assim a quantidade de mutações por erro de incorporação de nucleotídeos, conferindo maior estabilidade ao DNA. Além disso, a menor disponibilidade de folato reduzido, devido à menor eficiência da enzima na conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5- metilenotetrahidrofolato pode conferir menor capacidade replicativa à célula neoplásica.

Os resultados de Sailasree et al. (2011), não corroboram com esses estudos. O genótipo variante para o polimorfismo A1298C (CC ou AC + CC) foi detectado como preditor independente de falha no tratamento e menor sobrevida entre pacientes com câncer oral. A hipótese do autor é de que as elevadas concentrações de 5,10-metilenotetrahidrofolato e timidilato sintase associado às variantes A1298C podem favorecer a proliferação de células malignas residuais, resultando em recidiva da doença.

Na literatura várias investigações do polimorfismo A1298C para o risco de câncer de cabeça e pescoço, mostram relação com outros fatores de risco, como o trabalho de

Cao et al. (2010), em que a associação entre os genótipos variantes de A1298C com C677T apresentam risco aumentado para câncer de nasofaringe em fumantes.

O polimorfismo A1298C também possui vários estudos relacionados a outros tipos de câncer, mas os resultados são contraditórios. Qin et al. (2013), sugere que o polimorfismo atua como fator de proteção no câncer hepato celular; já Kwak et al. (2008), mostra que esse polimorfismo está relacionado com o aumento do risco para esse tipo de câncer.

A análise de risco para o polimorfismo CBS 844ins68 não apresentou resultados estatisticamente significantes. Galbiatti et al. (2010), não encontrou associação desse polimorfismo com o câncer oral, como no presente estudo, mas observou que indivíduos do sexo masculino, tabagistas, acima dos 50 anos de idade, tem risco aumentado para a doença.

Zhao et al. (2012), sugere que o gene CBS, devido a sua hipermetilação, funcione como um gene supressor em tumores gastrointestinais; esse tipo de alteração é comum em genes supressores de tumor em diversos tipos de câncer. Além disso, o estudo evidenciou que alterações no funcionamento desta enzima tem relação com a carcinogênese gastrointestinal. Evidenciamos também vários trabalhos associando esse polimorfismo a outras doenças, como risco de retardo mental (DUTTA et al., 2005); esquizofrenia (GOLIMBET et al., 2009) e episódios vasoclusivos em portadores de anemia falciforme (JABOB, BASTOS e BONINI-DOMINGOS, 2011).

Tsai et al. (2011) e Sailasree et al. (2011), sugerem que o polimorfismo MTHFR C677T pode ser um biomarcador útil para a previsão e prognóstico do câncer oral. Segundo revisão da literatura, por Galbiatti et al. (2012), os polimorfismos MTHFR C677T e MTHFR A1298C podem estar envolvidos com o risco para carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. No entanto, devido aos resultados contraditórios, são necessários estudos em diversas populações a fim de esclarecer o papel desses polimorfismos na etiologia desse tipo de câncer.

Polimorfismos genéticos são influenciados por origens étnicas e diferenças geográficas (IZMIRLI, 2013); o que justifica os resultados contraditórios encontrados na literatura.

Nossos resultados mostram que o diagnóstico molecular é uma ferramenta importante em casos de CEO. Tanto o polimorfismo C677T que mostrou atuar como fator de proteção, quanto o polimorfismo A1298C que está relacionado ao grau de diferenciação tumoral, são de grande relevância clínica e importantes para o prognóstico do paciente.

6. CONCLUSÕES

Em nossa casuística, concluímos que os polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C e CBS 844ins68 não estão correlacionados com o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide oral na população do Espírito Santo. Evidenciamos que o polimorfismo MTHFR C677T atua como fator de proteção. A combinação dos genótipos CT+TT revelou que o risco de comprometimento de linfonodos é três vezes menor comparado ao genótipo CC. O polimorfismo A1298C está relacionado com o grau de diferenciação tumoral. Combinados, os genótipos AC+CC foram mais frequentes nos tumores bem diferenciados, o que pode sugerir um melhor prognóstico. Observamos que estudos futuros com uma maior população de estudo e informações precisas sobre tabagismo, etilismo, etnia e dieta ajudarão a esclarecer melhor a interação desses polimorfismos com o carcinoma epidermóide oral.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. C. S. et al. **Prognostic factors in oral cancer**. Rev. Bras. de Ciências da Saúde, v.15, n. 4, p. 471-478, 2011.
- ARGIRIS, A. et al. **Head and neck cancer**. Lancet., v. 371, p. 1695–1709, 2008.
- BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. **Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes**: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. J. Nutr., v. 129, p. 919–922, 1999.
- BALAMURUGAN, K.; SAID, H. M. **Ontogenic regulation of folate transport across rat jejunal brush-border membrane**. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., v. 285, p. 1068–1073, 2003.
- BALAMURUGAN, K.; SAID, H. M. **Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake**. Am. J. Physiol. Cell Physiol., v. 291, p. 189–193, 2006.
- BALUZ, K. et al. **The role of folic acid on oncologic prevention and intervention**: review. Rev. Bras. de Cancerologia, v. 48, n. 4, p. 597-607, 2002.
- BHATNAGAR, R. et al. **Genome-wide disease association study in chewing tobacco associated oral cancers**. Oral Oncology, v. 48, p. 831–835, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM**: classificação de tumores malignos. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conduas do INCA. **Cancer epidermóide da cabeça e pescoço**. Rev. Bras. de Cancerologia, v. 47, n. 4, p. 361-376, 2001.
- BOCCIA, S. et al. **Meta-analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and risk of head and neck and lung cancer**. Cancer Letters, v. 273, p. 55–61, 2009.
- BOFFETTA, P. et al. **The burden of cancer attributable to alcohol drinking**. Int. J. Cancer, v. 119 p. 884–887, 2006.
- BRENER, S. et al. **Oral squamous cell carcinoma**: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment. Rev. Bras. de Cancerologia, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.
- BYAKODI, R. et al. **Oral cancer in India**: an epidemiologic and clinical review. J. Community Health, v. 37, p. 316–319, 2012.

CAO, Y. et al. **Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with a high risk of nasopharyngeal carcinoma in a smoking population from southern China.** *Molecular Carcinogenesis*, v. 49, p. 928–934, 2010.

CHIU, L. et al. **Oral cancer diagnostics based on infrared spectral markers and wax physisorption kinetics.** *Anal Bioanal Chem.*, v. 405, p. 1995–2007, 2013.

CHU, Y. et al. **Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer.** *Plos One*, v. 7, n. 6, p. e39777, 2012.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. **Genetic changes in head and neck cancer.** *Rev. Bras. de Cancerologia*, v. 55, n. 2, p.165-174, 2009.

DANIEL, F. I. et al. **Squamous cell carcinoma in lower alveolar ridge: diagnosis and odontologic support treatment.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, n. 4, p. 279-283, 2006.

DUTTA, S. et al. **Cystathionine β -synthase T833C/844ins68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children.** *Behavioral and Brain Functions*, v. 1, p. 25, 2005.

FAN, K. et al. **Combined-modality treatment for advanced oral tongue squamous cell carcinoma.** *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 67, n. 2, p. 453–461, 2007.

FELLER, L.; LEMMER, J. **New 'second primary' cancers.** *SADJ*, v. 67, n. 4, p. 175-178, 2012.

FRANCO, R. et al. **The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine β -synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis.** *Haematologica*, v. 83, p. 1006-1008, 1998.

FRISO, S. et al. **The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 14, p. 938-943, 2005.

GALBIATTI, A. L. S. et al. **The association between CBS 844ins68 polymorphism and head and neck squamous cell carcinoma risk – a case-control analysis.** *Arch. Med. Sci.*, v. 6, n. 5, p. 772-779, 2010.

GALBIATTI, A. N. S. et al. **Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism.** *Brazilian J. Otorhinolaryngology*, v. 78, n. 1, p. 132-139, 2012.

GOLIMBET, V. et al. **The 844ins68 polymorphism of the cystathionine β -synthase gene is associated with schizophrenia.** Psychiatry Research, v. 170, p. 168–171, 2009.

HASHIBE, M. et al. **Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium.** J. Natl. Cancer Inst., v. 99, p. 777–789, 2007.

HIYAMA, T. et al. **Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk.** Int. J. Cancer, v. 15, p. 1643–1658, 2007.

HOSSEINI-ASL, S.S. et al. **Decrease in gastric cancer susceptibility by MTHFR C677T polymorphism in Ardabil Province, Iran.** Turk J. Gastroenterol., v. 24, n.2, p. 117-121, 2013.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Incidência de câncer no Brasil.** 2012. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

IZMIRLI, M. **A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk.** Mol. Biol. Rep., v. 40, p. 625–637, 2013.

JACOB, M. A.; BASTOS, C. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. **The 844ins68 cystathionine beta-synthase and C677T MTHFR gene polymorphism and the vaso-occlusive event risk in sickle cell disease.** Clinical Research, v. 7, n. 1, p. 97-101, 2011.

KWAK, S. Y. et al. **Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) gene polymorphisms as risk factors for hepatocellular carcinoma in a Korean population.** Anticancer Research, v. 28, p. 2807-2812, 2008.

LEEMANS, C. R. et al. **The molecular biology of head and neck cancer.** Nature Reviews Cancer, v. 11, p. 9-22, 2011.

LINHART, H. G. et al. **Folate deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations.** Gastroenterology, v. 136, p. 227–235, 2009.

LIU, S. A. et al. **Impact of recurrence interval on survival of oral cavity squamous cell carcinoma patients after local relapse.** Otolaryngol. Head Neck Surg., v. 136, n. 1, p. 112-118, 2007.

LOURENÇO, S. Q. C. et al. **Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems.** Rev. Bras. de Cancerologia, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

MATTIA, E.; TOFFOLI, G. **Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms**. *Pharmacogenomics*, v. 9, p. 1195, 2008.

MONTORO, J. R. M. C. et al. **Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity**. *Brazilian J. Otorhinolaryngology*, v.74, n.6, p. 861-866, 2008.

NEUMANN, A. S. et al. **Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis**. *Int. J. Cancer*, v. 115, p. 131–136, 2005.

NEVILLE, B. W. et al. **Oral cancer and precancerous lesions**. *CA Cancer J. Clin.*, v. 52, p. 195-215, 2002.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. **Etiology of oral cancer: Alcohol**. *Br. J. Oral Maxillofacial Surgery*, v. 36, n.4, p. 247-251, 1998.

OLIVEIRA, L. R. et al. **Incidence and survival profile of patients with oral squamous cell carcinoma in a Brazilian population**. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, n. 5, p. 385-392, 2006.

PADILLA, R.; RITTER, A. V. **Oral cancer**. *Wiley Periodicals, Inc.*, v. 20, n. 3, p. 212-213, 2008.

PAI, S. I.; WESTRA, H. **Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment**. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v. 4, p. 49–70, 2009.

PAZ, M. F. et al. **Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors**. *Cancer Research*, v. 62, p. 4519-4524, 2002.

PEREZ-ORDENÉZ, B. et al. **Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck**. *J. Clin. Pathol.*, v. 59, p. 445–453, 2006.

PUT, N. M. J. et al. **A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?** *Am. J. Hum. Genet.*, v. 62, p. 1-8, 1998.

QIN, X. et al. **The association between MTHFR gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk: A Meta-Analysis**. *Plos One*, v. 8, n. 2, p. e56070, 2013.

ROBBINS, K. T. **Neck dissection classification update**. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v. 128, p. 751-758, 2002.

ROCHA, A. P. et al. **Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

RODRIGUES, J. O. et al. **Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and risk of head and neck squamous cell carcinoma.** Brazilian Journal Otorhinolaryngology, v. 76, n. 6, p. 776-782, 2010.

ROSADO, J. O.; SALVADOR, M.; BONATTO, D. **Importance of the trans-sulfuration pathway in cancer prevention and promotion.** Mol. Cell Biochem., v. 301, p. 1–12, 2007.

SAILASREE, R. **Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in oral cancer patients.** J. Oral Pathol. Med., v. 40, p. 61–66, 2011.

SHINGAKI, S. et al. **Squamous cell carcinomas of the mandibular alveolus: analysis of prognostic factors.** Oncology, v. 62, n. 1, p. 17-24, 2002.

SHRUBSOLE, M. J. et al. **MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai breast cancer study.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v. 13, p. 190-196, 2004.

SOHN, K. et al. **Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate.** J. National Cancer Institute, v. 96, p. 134-144, 2004.

SOLOMON, P. R. et al. **Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians.** Oral Diseases, v. 14, p. 633–639, 2008.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. **World Cancer Report.** Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2003. 351p.

STURGIS, E. M.; WEI, Q. **Genetic susceptibility–molecular epidemiology of head and neck cancer.** Current Opinion in Oncology, v. 14, p. 310–317, 2002.

SUPIC, G. et al. **Interaction between the MTHFR C677T polymorphism and alcohol – impact on oral cancer risk and multiple DNA methylation of tumor-related genes.** J. Dent. Res., v. 90, n. 1, p. 65-70, 2011.

SUZUKI, T. et al. **One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case–control study.** Cancer Sci., v. 98, p. 1439–1446, 2007.

TEIXEIRA, A. K. M. et al. **Oral squamous cell carcinoma: an epidemiological study conducted at Santa Casa de Misericórdia Hospital of Fortaleza - CE, Brazil.** Rev. Bras. de Cancerologia, v. 55, n. 3, p. 229-236, 2009.

TRALONGO, V. et al. **Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma.** Anticancer Research, v. 19, n. 4, p. 3503-3510, 1999.

TSAI, C. W. et al. **Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype, smoking habit, metastasis and Oral Cancer in Taiwan.** Anticancer Research, v. 31, n. 6, p. 2395-2399, 2011.

VAIRAKTARIS, E. et al. **Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer.** J. Cancer Res. Clin. Oncol., v. 132, p. 219–222, 2006.

WU, X.; LU, L. **Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer.** Asian Pacific J. Cancer Prev., v. 13, n. 11, p. 5333-5338, 2010.

WU, X. et al. **Effects of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphisms on cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 379, p. 732–737, 2009.

YAKUB, M. et al. **Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population.** Plos One, v. 7, n. 3, p. e32222, 2012.

YAMASAKI-YASHIKI, S. et al. **Determination of L-methionine using methionine-specific dehydrogenase for diagnosis of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency.** Anal Biochem., v. 428, p. 143-149, 2012.

YANG, C. et al. **Gene - environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan.** Carcinogenesis, v. 26, n. 7, p. 1285-1290, 2005.

ZHANG, Z. et al. **Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v. 9, p. 1043–1049, 2000.

ZHAO, H. et al. **Frequent epigenetic silencing of the folate-metabolising gene cystathionine β -Synthase in gastrointestinal cancer.** Plos One, v. 7, n. 11, p. e49683, 2012.

ZHUO, X. et al. **Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C association with oral carcinoma risk: a meta-analysis.** Cancer Invest., v. 30, n. 6, p. 447-452, 2012.

ANEXOS



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

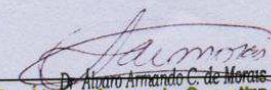
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Amado Carvalheiro de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CASOS

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo **Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca HSRC/SESA (Hospital Santa Rita de Cássia– Secretaria Estadual de Saúde/ES)** e pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer. Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete o tratamento médico que você está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que você faça uma entrevista e forneça amostras de sangue ou saliva e de tecido (tumor). Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se você decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas (sangue e tumor).

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto você estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que você doe uma amostra de sangue ou saliva enquanto estiver no hospital. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 mL de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual, ou uma raspagem na parte interna da bochecha para coleta de células. Se disponível, nós solicitaremos ao Departamento de Patologia do hospital uma pequena amostra do seu tumor.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue/saliva e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise das características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Concordando com este estudo você estará autorizando que estas amostras sejam armazenadas por um período de 05 anos, podendo ser solicitada prorrogação deste prazo, para serem utilizadas em investigações futuras. Toda nova pesquisa a ser realizada utilizando estas amostras deverá ser submetida à nova aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado permanecerá armazenado. Você tem o direito de saber, a qualquer momento, dos resultados de exames realizados em suas amostras, tendo ou não aplicabilidade clínica. Não haverá nenhum custo financeiro para você participar deste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, você pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for realizada a coleta. É possível, mas não provável, que você apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado ao medo de agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Ao participar desta pesquisa, você será orientado sobre hábitos e estilo de vida que poderão contribuir para o sucesso de seu tratamento, além de orientação especializada pelos médicos e cirurgiões-dentistas da equipe sobre cuidados e prevenção das complicações decorrentes do tratamento ao qual será submetido. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa e também poderá trazer benefício às gerações futuras.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

Será realizada a codificação de todo material e informação obtidos, objetivando garantir o sigilo e o respeito à confidencialidade. As informações serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa, terá acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que você nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será divulgado em nenhum relatório ou trabalho científico.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

Você pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se você inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de ideia e enviar notificação por escrito para o coordenador da pesquisa do Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca HSRC/SESA (Hospital Santa Rita de Cássia– Secretaria Estadual de Saúde/ES, todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado “sim” e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado “não”. Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

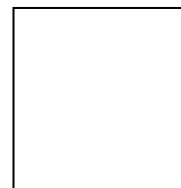
SIM NÃO Parte do estudo

☐ ☐ Entrevista

☐ ☐ Coleta e teste do sangue

☐ ☐ Coleta de amostras de tumor e testes relacionados

☐ ☐ Acesso aos prontuários médicos



Assinatura do participante Data

Assinatura da testemunha Data

Nome

Nome da testemunha

Nome e assinatura do Pesquisador
Responsável

Data: _____

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se você tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá; coordenador do Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca HSRC/SESA, no telefone (27) 3334-8383 ou você pode escrever-lhe, no seguinte endereço: Hospital Santa Rita de Cássia -Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca. Av Marechal Campos, s/nº Maruípe, Vitória/ES, CEP 29041091.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo **Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca HSRC/SESA (Hospital Santa Rita de Cássia– Secretaria Estadual de Saúde/ES** e pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer. Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete o tratamento médico que você está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que você faça uma entrevista e forneça amostra de sangue. Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se você decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto você estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que você doe uma única amostra de sangue ou saliva. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 mL de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual, ou uma raspagem na parte interna da bochecha para coleta de células.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A amostra de sangue/saliva será enviada a laboratórios para análise das características genéticas e celulares. Concordando com este estudo você estará autorizando que esta amostra seja armazenada por um período de 05 anos, podendo ser solicitada prorrogação deste prazo, para ser utilizada em investigações futuras. Toda nova pesquisa a ser realizada utilizando esta amostra deverá ser submetida à nova aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

A amostra biológica obtida será utilizada apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado permanecerá armazenado. Você tem o direito de saber, a qualquer momento, dos resultados de exames realizados em sua amostra biológica, tendo ou não aplicabilidade clínica. Não haverá nenhum custo financeiro para

you participate in this study and there is no compensation or payment for completing the questionnaire and providing biological samples.

DISCOMFORT AND POTENTIAL RISKS

During the blood collection, you may feel a little pain or present a hematoma (red mark) on the arm, at the site where the needle was inserted. It is possible, but not probable, that you may present swelling or bleeding at the puncture site. There may also be discomfort related to needles. It is improbable that physical damage will occur from the blood collection. If these damages occur, you will be immediately treated by the hospital professionals.

POTENTIAL BENEFITS

By participating in this research, you will be oriented about habits and lifestyle that will contribute to the prevention and detection of oral cancer through specialized orientation by doctors and dentists on the team. Your participation is very important for the success of this research and will also bring benefit to future generations.

CONFIDENTIALITY GUARANTEE

There will be coding of all material and information obtained, aiming to guarantee confidentiality. The information will be used only for scientific purposes, in accordance with Brazilian legislation. No one, except the research team, will have access to your responses and test results. Your employer (patron) will not have access to any results or information that you provide. The biological samples will not be labeled with your name. Your name will not be disclosed in any report or scientific work.

RIGHT TO WITHDRAW FROM THE STUDY

You can refuse to participate and/or withdraw your consent and interrupt participation at any time, without any penalty or loss of any benefit that you have received previously. If you initially decide to give your consent for the storage of biological samples for future research, but later change your mind and send a written notification to the research coordinator of the Program for Early Detection and Prevention of Oral Cancer HSRC/SESA (Hospital Santa Rita de Cássia – State Secretariat of Health/ES), all remaining samples of your biological samples will be destroyed. Your decision on this matter will not affect your medical treatment or your employment.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado “sim” e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado “não”. Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM NÃO Parte do estudo

☐ ☐ Entrevista

☐ ☐ Coleta e testes em amostras de sangue

☐ ☐ Acesso aos prontuários médicos



Assinatura do Participante Data

Assinatura da testemunha Data

Nome do Participante

Nome da testemunha

Nome e assinatura do Pesquisador
Responsável _____

Data: _____

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se você tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá; coordenador do Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca HSRC/SESA, no telefone (27) 3334-8383 ou você pode escrever-lhe, no seguinte endereço: Hospital Santa Rita de Cássia -Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca. Av Marechal Campos, s/nº Maruípe-Vitória ES CEP 29041091.